

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年4月19日 (19.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/26694 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, (74) 代理人: 渡村 皓 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06947
- (22) 国際出願日: 2000年10月5日 (05.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/288532 1999年10月8日 (08.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メドジェン バイオサイエンス株式会社 (MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]; 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番C-1101号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森下 竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP). 谷山 義明 (TANIYAMA, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒567-0048 大阪府茨木市北春日丘4-11-38 グランドール山口302 Osaka (JP). 荻原 俊男 (OGIHARA, Toshio) [JP/JP]; 〒562-0046 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE THERAPY FOR CARDIOMYOPATHY

(54) 発明の名称: 心筋症遺伝子治療

(57) Abstract: Noninvasive administration of HGF gene in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome into injured myocardium under echography makes it possible to promote angiogenesis and inhibit fibrosis in the myocardial layer, thereby restoring heart functions.

(57) 要約:

損傷を受けた心筋内に、センダイ・ウイルス (HVJ) -リポソームの形態にあるHGF遺伝子を、エコー使用下、非侵襲的に投与することにより、心筋層の血管新生の促進と線維化抑制を図り、心機能を回復させることができる。

WO 01/26694 A1

明 細 書

心筋症遺伝子治療

技術分野

- 5 本発明は、HGF 遺伝子を非侵襲的に投与して心筋障害を治療する遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤に関する。具体的には、HGF 遺伝子を心筋内に非侵襲的に投与することからなる心筋障害遺伝子治療法、特に、エコー使用下でHGF 遺伝子を障害心筋部位に注入し、より効率的に心筋症等の心疾患又は狭心症、心不全を治療する心筋障害遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤に関する。更に、
- 10 HGF 遺伝子以外の他の遺伝子にも適用可能な遺伝子治療法であって、エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に遺伝子を投与することからなる遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤に関する。

背景技術

- 近年のめざましい医療技術の向上に関わらず循環器領域においては、未だ多く
- 15 の問題が未解決であり、その中の一つの重要な課題として、心筋障害の問題が挙げられる。

- 心筋障害とは心筋の器質的および機能的異常に起因する疾患の総称であり、例えば心筋症の場合、高血圧、代謝異常症、虚血等の基礎疾患に続発する二次性心筋症と、明らかな基礎疾患なしに発症する突発性心筋症（ICM）に分類される。
- 20 ICMのうち、遺伝子レベルでの病因解明が最も進んでいるのは肥大型心筋症（HCM）である。HCMでは患者の半数以上に常染色体性優性遺伝形式に従う明らかな家族歴が認められる。このような多発家系を対象とした連鎖解析が行われ、これまでに5つの原因遺伝子座が同定され、その内の4座では原因遺伝子自体が特定されている。
- 25 また、拡張型心筋症（DCM）の症例の多くは孤発例であるが、約20%には家族歴が認められる。このような多発家系を対象とした連鎖解析から、7種の原因遺伝子座（ただし原因遺伝子は不明）が特定されている。

しかしながら、心筋障害に関しては、このように原因遺伝子の特定と発症機構の解明についての研究が行われている状況であり、遺伝子治療に向けた具体的な

動きは現在まで行われていない。

一方で、最近の分子生物学の飛躍的向上により、遺伝子導入法による細胞機能の賦活化が可能となり、種々の取り組みがなされてきた。特に、心臓への遺伝子導入法については、静脈内注入法 (J. Clin. Invest., 90, 626-630(1992))、直接注
5 入法 (Circulation, 82, 2217-2221(1990)、Circulation, 90, 2414-2424(1994)) 又は、プラスミドをそのまま用いる冠動脈内拡散注入法 (J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 109, 716-720(1995))等の幾つかの報告があるものの、非侵襲的で具体的な治療法につながるものではなかった。

発明の開示

- 10 本発明は、これまで有効な治療法が見出されていなかった心筋障害の非侵襲的な治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的とする。すなわち本発明は、HGF 遺伝子を非侵襲的に投与して心筋障害を治療する遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的とする。具体的には、HGF 遺伝子を心筋内に非侵襲的に投与することからなる心筋障害遺伝子治療法、特に、エコー使
15 用下でHGF 遺伝子を障害心筋部位に注入し、より効率的に心筋症等の心疾患又は狭心症、心不全を治療する心筋障害遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的とする。更に、HGF 遺伝子以外の他の遺伝子にも適用可能な遺伝子治療法であって、エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に遺伝子を投与することからなる遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的と
20 する。

本発明者らは鋭意検討の結果、遺伝子としてHGF 遺伝子を使用し、非侵襲的に直接患部心筋層に注入することで有効な効果が得られることを見出した。すなわち本発明者らは、患部を切開あるいは開胸することなく、エコー使用下で視覚的に患部心筋層にHGF 遺伝子を注入することが効果的であることを見出した。

- 25 当該治療法は非侵襲的な治療法であるため、病状に応じて何回でも当該遺伝子を投与することが可能であり、従って効果的な心筋障害の治療を行うことができる。

このように、本発明者らはエコー使用下で視覚的に直接患部組織に遺伝子を投与することにより効果的な治療が行えることをはじめて見いだしたものであり、各種の臓器特異的な疾患の遺伝子治療が本発明方法で可能であることを明らかに

した。

例えば、HGF遺伝子を用いる場合、本発明の方法により、各種の臓器特異的な疾患、例えば肺線維症あるいは、肝硬変、肝線維症等の治療を行うことも可能である。更に、HGF遺伝子以外の他の遺伝子治療用の遺伝子も、前記本発明の

5 方法により効果的な治療を行なうことができる。

すなわち本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) HGF遺伝子を有効成分として含有する、非侵襲的投与のための心筋障害治療剤、

(2) HGF遺伝子を心筋内に投与するための、上記(1)記載の治療剤、

10 (3) HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリポソームの形態にある、上記(1)又は(2)記載の治療剤、

(4) エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与するための、上記(2)又は(3)記載の治療剤、

(5) 少なくとも各週1回で8回投与するための、上記(1)～(4)のいずれ
15 か記載の治療剤、

(6) HGF遺伝子として少なくとも10 μ gを用いる、上記(1)～(5)のいずれか記載の治療剤、

(7) 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、上記(1)～(6)のいずれか記載の治療剤、

20 (8) 障害の治療に有効な遺伝子を有効成分として含有する、エコー使用下に障害組織部位に該遺伝子を非侵襲的に投与するための遺伝子治療剤、

(9) 組織障害部位が心筋である、上記(8)記載の治療剤、

(10) 遺伝子がHGF遺伝子である、上記(8)又は(9)記載の治療剤、

(11) HGF遺伝子を非侵襲的にヒトを含む哺乳動物の心筋内に投与すること
25 を含む、心筋障害の遺伝子治療法、

(12) HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリポソームの形態にある、上記(11)記載の治療法、

(13) HGF遺伝子を、エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与する、上記(11)又は(12)記載の治療法、

- (14) HGF遺伝子を少なくとも各週1回で8回投与する、上記(11)～(13)のいずれか記載の治療法、
- (15) 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、上記(11)～(14)のいずれか記載の治療法、
- 5 (16) エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与することを含む、遺伝子治療法、
- (17) 障害組織が心筋である、上記(16)記載の治療法、
- (18) 遺伝子がHGF遺伝子である、上記(16)又は(17)記載の治療法、
- (19) 非侵襲的投与用心筋障害治療剤の製造のためのHGF遺伝子の使用、
- 10 (20) HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリポソームの形態にある、上記(19)記載の使用、
- (21) エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的にHGF遺伝子を投与するための治療剤である、上記(19)又は(20)記載の使用、
- (22) 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、上記(19)～(21)のいずれか記載の使用、
- 15 (23) エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与するための遺伝子治療剤製造のための遺伝子の使用、
- (24) 障害組織が心筋である、上記(23)記載の使用、
- (25) 遺伝子がHGF遺伝子である、上記(23)又は(24)記載の使用。

20 図面の簡単な説明

図1は、心筋症ハムスターの心臓にHVJを用いてレポーター遺伝子であるルシフェラーゼを導入し、ルシフェラーゼ活性値が高値を示したことで、エコー使用下に遺伝子導入が可能であることが証明された結果を示すグラフである。

図2は、心臓における毛細血管密度をALP染色で測定し、HGF遺伝子とコントロールを比較した結果を示すグラフである。

図3は、心臓の血流量をレーザー・ドップラー・イメージャー(LDI)スコアで評価し、HGF遺伝子群とコントロール群、非処理群とを比較した結果を示すグラフである。

図4は、心筋における線維化の分布密度をMasson染色で測定し、HGF遺伝子

とコントロールを比較した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明で使用されるHGF遺伝子とは、HGFを発現し得る遺伝子を言い、当該遺伝子には、発現されるポリペプチドがHGFと実質的に同効である限り、その遺伝子配列の一部が欠失又は他の塩基により置換されていたり、他の塩基配列が一部挿入されていたり、5'末端及び／又は3'末端に塩基が結合したような遺伝子も包含される。かかる遺伝子としては、例えば、Nature, 342, 440(1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 321(1990)などに記載のHGF遺伝子が例示され、これらの遺伝子を本発明で使用する事が出来る。

ここでHGF遺伝子(HGFをコードするcDNA)の塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。またHGF遺伝子の改変等も、前記基本書に従い当業者ならば容易に行うことができる。

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

HGF遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与法が詳しく解説されている(別冊実験医学, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、別冊実験医学, 遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス, 1999)。以下、具体的に説明する。

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入すること

ができる。

細胞への遺伝子導入法としては、リポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法などが挙げられる。

- 5 また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム (internal type liposome) による遺伝子導入法、静電気型リポソーム (electrostatic type liposome) による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法 (HVJ-AVEリポソーム法)、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体 (金属粒子) とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked
- 10 -DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

- このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス (Hemagglutinating virus of Japan : HVJ) とを融合させたものである。当
- 15 該HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ-リポソームの調製法については文献 (実験医学別冊, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、J. Clin. Invest. 93, 1458-1464 (1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220 (1996)) などに詳しく述べられているため、それらを参照されたい。またHVJリポソーム法とは、例えば
- 20 Molecular Medicine, 30, 1440-1448 (1993)、実験医学, 12, 1822-1826 (1994)、蛋白質・核酸・酵素, 42, 1806-1813 (1997) 等に記載の方法であり、好ましくは Circulation, 92 (Suppl. II), 479-482 (1995) に記載の方法が挙げられる。

- なおHVJとしてはZ株 (ATCCより入手可能) が好ましいが、基本的には他の
- 25 HVJ株 (例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など) も用いることができる。

さらに、naked-DNAの直接導入法は、上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点から好ましい導入法である。

ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであつても良いが、例えば

pCAGGS (Gene 108, 193-200(1991)) や、pBK-CMV、p cDNA 3.1、pZeoSV (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現ベクターが挙げられる。

B. ウイルスベクターを用いる場合

- 5 ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス (HIV) 等のDNA
- 10 ウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

- 15 本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある
- (日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、日本遺
- 20 伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス、1999)。本発明では、*in vivo* 法が好ましい。

- 製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態 (例えば液剤など) をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤 (PBS等の緩
- 25 衝液、生理食塩水、滅菌水等) に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

本発明で導入されるHGF遺伝子以外に、内因性の心筋保護因子や心筋細胞における再生因子を併用することが可能である。例えば、心筋細胞障害時に高度に発現されるTGF- β や熱ショック蛋白(HSP)等の因子は、心筋障害を軽減し心筋修復に関与することが報告されているため、これらの遺伝子を使用すること
5 ともできる。又、EGF等の増殖因子は、組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。更には、これらの心筋保護因子や再生因子以外にも、心筋保護や再生に関与する因子も用いることができる。

本発明では、このようにHGF遺伝子を単独にあるいは他の遺伝子と組み合わせ
10 せて心臓の心筋細胞に導入し、高度に発現させて、損傷を受けた心筋細胞等に必要目的蛋白を供給することができる。そしてこれにより、損傷を受けた心筋細胞等の賦活化を図って心筋細胞等を修復再生させ、心筋障害に陥った心機能の回復正常化が出来ることになる。従って本発明の遺伝子治療剤は、重症の心筋症患者に適用が可能であり、心臓移植以外には治療の手段がない患者の救済も可能と
15 なった。

さらに本発明の治療剤は、重症の心筋症患者だけでなく、進行中の軽度の心筋症患者にも使用することができる。また、狭心症や心不全等の心筋障害の患者にも使用することができる。

本発明の遺伝子治療剤は、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与方法
20 ・投与部位が選択される。投与部位としては、心筋内(障害心筋部位)への投与が好ましい。また投与方法としては、非経口的に投与することが好ましい。

非経口的な投与方法の好ましいものとして、例えば、非侵襲的なカテーテルあるいは非侵襲的な注射器等による投与方法を挙げることができる。更に好ましくは、エコー使用下での非侵襲的なカテーテルあるいは注射器等による投与方法を
25 挙げることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、心筋内に直接HGF遺伝子を注入する方法が挙げられる。

本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、HGF遺伝子として成人患者当たり0.0001mg~100mg、好ましくは0.001~10mg程度の投与量が挙げられる。

またH V Jーリボソームの形態をとる場合は、H G F 遺伝子として成人患者当たり約1～約4 0 0 0 μ g の範囲、好ましくは約1 0～約4 0 0 μ g の範囲から投与量が選択される。

本発明の治療剤は、数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、好ましくは各週1回の投与が挙げられる。

投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。治療目的に応じて複数回が好適であり、好ましくは8回投与することが挙げられる。

更に、本発明においては、エコー使用下に障害組織部位に障害の治療に有効な遺伝子を非侵襲的に投与することを含む、新規な遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤も提供される。すなわち本発明においては、エコー使用下で視覚的に直接患部組織に遺伝子を投与することにより、効果的な治療が行なえることを初めて見出した。当該治療法では、遺伝子を非侵襲的に投与するため、病状に応じて何回でも所望の遺伝子を投与することが可能であるという、従来にない利点を有する。このような本発明の遺伝子治療法は、H G F 遺伝子に限らず、遺伝子治療用のあらゆる遺伝子に適用可能である。当該遺伝子治療法は、特に、障害心筋部位に対して適用された場合に効果的である。その際に投与される遺伝子としては、H G F 遺伝子やT G F - β 遺伝子、H S P 遺伝子、V E G F 遺伝子、F G F 遺伝子、E G F 遺伝子等が挙げられる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実験材料及び方法

実験動物

心筋症ハムスター (B i o 1 4 . 6) はオリエンタル酵母から購入した。

H G F 遺伝子

25 ヒトH G F 遺伝子は、ヒトのH G F のc D N A (特許第2777678号) を常法によりクローニングし、これを発現ベクターp c D N A (インビトロゲン社製) に挿入したものをを用いた。

実験方法

1. エコー使用下に心筋症ハムスターの心臓にH V J リボソームを用いてレポー

ター遺伝子であるルシフェラーゼを導入し、1週間後にその活性を調べた。コントロール群はPBSのみをエコー使用下に導入した。ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (LamatLB9507 (BERTHOLO社)) で測定した。

2. エコーカルジオグラム (MD 500, YOKOKAWA-GE) の操作下、
- 5 心筋症ハムスター (12週齢) の心臓の腹部側心筋にHVJ-リポソーム製剤を注入し、以下の1) ~ 3) の検討を行った。

1) 心筋内の毛細血管密度をALP染色で測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較した。

- 2) HVJ-リポソーム製剤が投与された心臓の血流量を、レーザー・ドップラー・イメージャー (LDI) スコアで評価し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較した。
- 10

3) 心筋のMasson染色を行い、コンピュータ解析により線維化の分布密度を測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較した。

参照例 1

15 HVJリポソーム製剤の作製

- 10mgの乾燥脂質 (ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、コレステロールの1:4.8:2の混合物) と、HGF遺伝子 (100 μ g) -HMG1 (high mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g) を含有する等張液 (137 μ M NaCl, 5.4 μ M KCl, 10 μ M Tris-HCl; pH7.6) 200 μ lを混合し、激しく攪拌して超音波を掛けてリポソームを形成させた。精製センダイウイルス (Z株) を3分間UV照射 (110erg/mm²/sec) した。リポソーム懸濁液とセンダイウイルス (HVJ) を混合して4 $^{\circ}$ C 10分間、続いて37 $^{\circ}$ C 30分間加温した。遊離のHVJを除去して、HVJリポソーム製剤を取得した。
- 20

参考例 2

25 ルシフェラーゼ活性の測定

ハムスター (1群6匹) にルシフェラーゼ遺伝子10 μ gのリポソーム製剤を投与し、1週間後にルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図1に示す。

図1に示されるとおり、心臓におけるルシフェラーゼは高値を示し、エコー使用下に遺伝子導入が可能であることが証明された。

実施例 1

心筋症ハムスターのHGF遺伝子による治療

- 1 2週齢の心筋症ハムスター（1群6匹）の心臓の腹部側心筋にリポソーム製剤を注入した。コントロール群としては、コントロールベクターの入ったリポソーム製剤を同様に12週齢の心筋症ハムスター（1群6匹）に注入した群を設け、
- 5 未処理群として無処置の心筋症ハムスター（1群6匹）を設けた。その後、各週にリポソーム製剤を計8回注入した。8週後、20週齢の心筋症ハムスターの心臓の心筋内の毛細血管密度をALP染色で測定し、血流量をLDIスコアで評価した。また、ハムスターを安楽死させた後、心臓を摘出しMasson染色後に、
- 10 コンピュータによる解析にて線維化の分布密度を測定した。

ALP染色により、HGF遺伝子治療群では顕著に血管新生による毛細管密度の上昇が見られた。この結果を図2に示す。

LDIスコアは、コントロール群を100%とすると、HGF遺伝子治療群では $163 \pm 7\%$ であり、顕著に血流量が増大していた。この結果を図3に示す。

- 15 Masson染色の解析では、HGF遺伝子治療群で顕著な線維化分布密度の減少が見られた。この結果を図4に示す。

産業上の利用可能性

- 本発明のHGF遺伝子を有効成分とする心筋障害治療剤は、患部心筋の血管新生を促し、患部の血流量を増大させると共に、心筋の線維化を抑制、軽減し、心
- 20 機能を回復させることができる。また本発明の治療剤は、エコー使用下視覚的に患部心筋層へ、非侵襲的にかつ的確に注入することができる。従ってこれらの効果により、本発明の治療剤は心筋障害をより効果的に治療することができるものである。

請 求 の 範 囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を有効成分として含有する、非侵襲的投与のための心筋障害治療剤。
- 5 2. HGF 遺伝子を心筋内に投与するための、請求項 1 記載の治療剤。
3. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリボソームの形態にある、請求項 1 又は 2 記載の治療剤。
4. エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与するための、請求項 2 又は 3 記載の治療剤。
- 10 5. 少なくとも各週 1 回で 8 回投与するための、請求項 1～4 のいずれか記載の治療剤。
6. HGF 遺伝子として少なくとも 10 μ g を用いる、請求項 1～5 のいずれか記載の治療剤。
7. 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、請求項 1～6 のいずれか記載の治療剤。
- 15 8. 障害の治療に有効な遺伝子を有効成分として含有する、エコー使用下に障害組織部位に該遺伝子を非侵襲的に投与するための遺伝子治療剤。
9. 組織障害部位が心筋である、請求項 8 記載の治療剤。
10. 遺伝子が HGF 遺伝子である、請求項 8 又は 9 記載の治療剤。
- 20 11. HGF 遺伝子を非侵襲的にヒトを含む哺乳動物の心筋内に投与することを含む、心筋障害の遺伝子治療法。
12. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリボソームの形態にある、請求項 11 記載の治療法。
13. HGF 遺伝子を、エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与する、請求項 11 又は 12 記載の治療法。
- 25 14. HGF 遺伝子を少なくとも各週 1 回で 8 回投与する、請求項 11～13 のいずれか記載の治療法。
15. 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、請求項 11～14 のいずれか記載の治療法。

16. エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与することを含む、遺伝子治療法。
17. 障害組織が心筋である、請求項 16 記載の治療法。
18. 遺伝子が HGF 遺伝子である、請求項 16 又は 17 記載の治療法。
- 5 19. 非侵襲的投与用心筋障害治療剤の製造のための HGF 遺伝子の使用。
20. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス (HVJ) - リポソームの形態にある、請求項 19 記載の使用。
21. エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に HGF 遺伝子を投与するための治療剤である、請求項 19 又は 20 記載の使用。
- 10 22. 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、請求項 19 ~ 21 のいずれか記載の使用。
23. エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与するための遺伝子治療剤製造のための遺伝子の使用。
24. 障害組織が心筋である、請求項 23 記載の使用。
- 15 25. 遺伝子が HGF 遺伝子である、請求項 23 又は 24 記載の使用。

1/2

FIG. 1

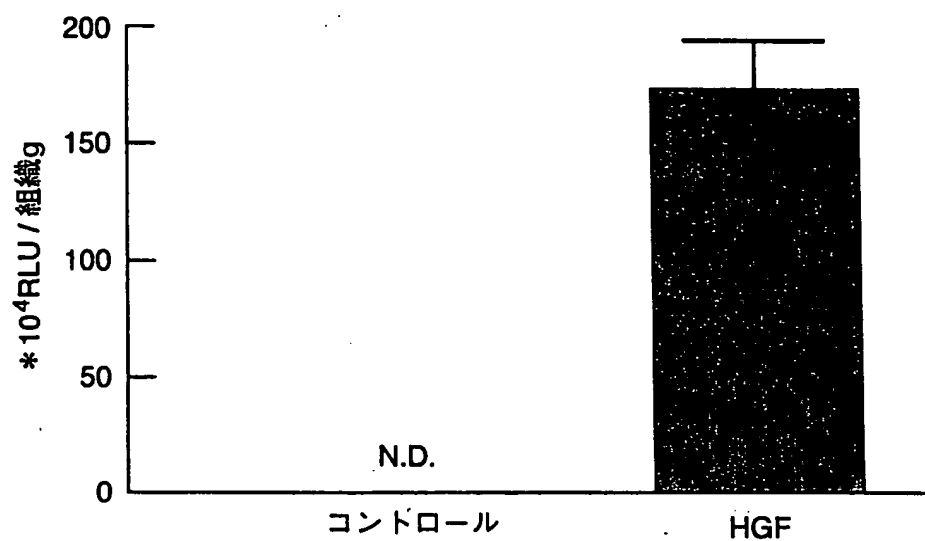
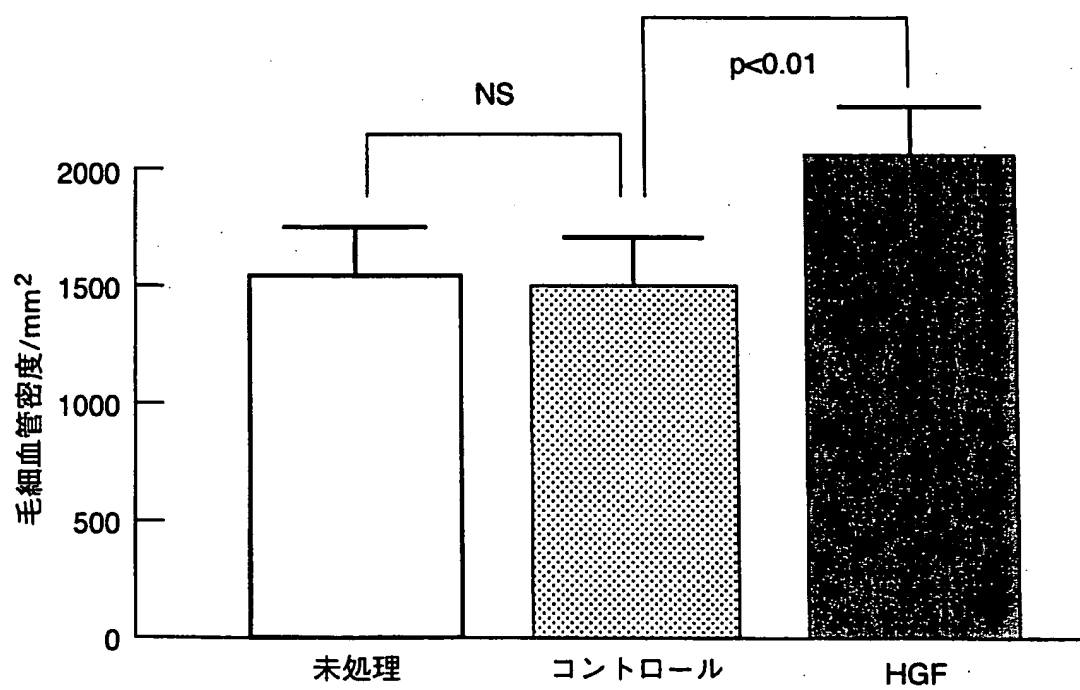


FIG. 2



2/2

FIG. 3

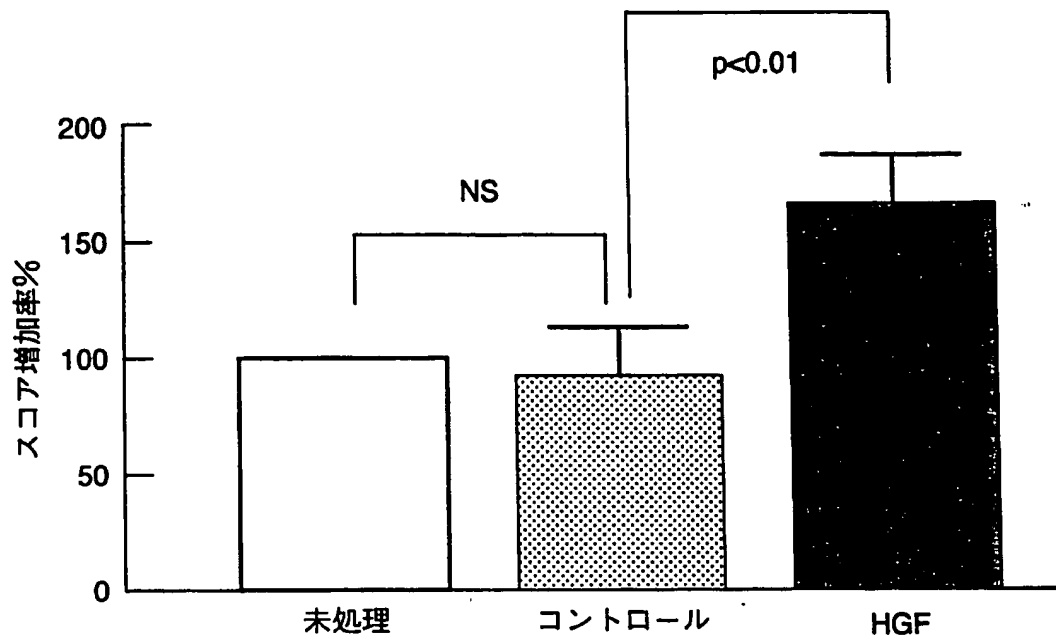
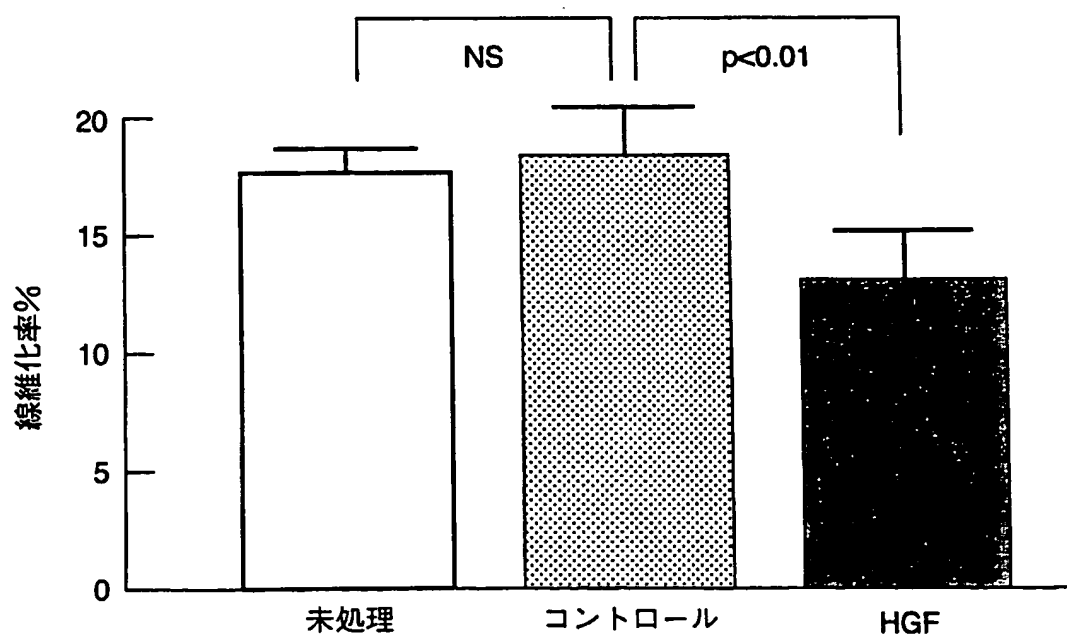


FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06947

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P9/10, 9/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P9/10, 9/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ESAKOF D.D.et al., "Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris", HUMAN GENE THERAPY, (1999) Vol.10, No.14, pp.2307-2314	8, 9, 23, 24 1-7, 10, 19-22, 25
Y	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, pp.1321	1-7, 10, 19-22, 25
Y	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol.90, pp.1937-1941	1-7, 10, 19-22, 25
Y	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol.97, pp.381-390	1-7, 10, 19-22, 25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06947

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11 to 18 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/06947

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P 9/10, 9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P 9/10, 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	ESAKOF D.D. et al., "Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris", HUMAN GENE THERAPY, (1999) Vol. 10, No. 14, p. 2307-2314	8, 9, 23, 24 1-7, 10, 19-22, 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子

印

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, p. I321	1-7, 10, 19-22, 25
Y	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol. 90, p. 1937-1941	1-7, 10, 19-22, 25
Y	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol. 97, p. 381-390	1-7, 10, 19-22, 25

国際出願番号 PCT/JP00/06947

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった

- 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

DESCRIPTION

GENE THERAPY FOR CARDIOMYOPATHY

5 Technical Field

The present invention relates to a method of gene therapy for treating myocardial pathology by noninvasive administration of an HGF (hepatocyte growth factor) gene and therapeutic agents used therefor. More specifically, the present invention relates to a method of gene therapy for treating myocardial pathology by noninvasive administration of an HGF gene into the cardiac muscle, especially to a method of gene therapy that more efficiently treats heart disease, such as cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure, by injecting an HGF gene into the affected part of cardiac muscle under the usage of echo, and to therapeutic agents used therefor. Moreover, the present invention relates to a method of gene therapy which is applicable to genes other than HGF genes and that consists of administering genes to the affected part of tissue noninvasively under the usage of echo.

20 Background Art

In spite of the recent striking technical improvements in the medical field, many problems remain unsolved. The problem of myocardial pathology is one of the important unsolved subjects.

Myocardial pathology is a general name for diseases attributable to organic and functional abnormalities of the cardiac muscle. For example, cardiomyopathy is classified into secondary cardiomyopathy, which occurs in sequence to hypertension, dysrhythmia, ischemic disease and such, and idiopathic cardiomyopathy (ICM), which occurs without any distinct fundamental disease. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is classified as an ICM, whose cause of disease is most revealed at the genetic level. In half the numbers of patients with HCM, familial history following autosomal dominant heredity is recognized. Linkage analysis of such family lines, with multiple patients as the object, revealed 5 causal

loci so far and the causal gene itself is specified in 4 of them.

Many cases of dilated cardiomyopathy (DCM) occur independently, but familial history is recognized in 20% of the cases. Linkage analysis of such family lines, with multiple patients as the object, revealed
5 7 types of causal loci (causal genes are unknown).

Regarding myocardiopathy, research is in progress to specify causal gene and to reveal the mechanism underlying the start of disease. So far, no concrete action for gene therapy has been done.

On the other hand, the rapid progress lately in molecular biology
10 has made it possible to activate cellular function by gene transfer methods and various attempts have been made. In particular, there are some reports for gene transfer methods to the heart, like intravenous drip (J.Clin.Invest., 90, 626-630 (1992)), direct injection (Circulation, 82, 2217-2221 (1990); Circulation, 90, 2414-2424 (1994)) or coronary
15 diffusional infusion method that utilizes the plasmid as it is (J.Thorac.Cardiovasc.Surg., 109, 716-720 (1995)) and so on, but were far from noninvasive concrete treatment.

Disclosure of the Invention

20 The object of this invention is to provide a noninvasive treatment for myocardiopathy, for which effective treatment is currently unknown, and therapeutic agents used therefor. That is, the present invention relates to a method of gene therapy for treating myocardiopathy by noninvasive administration of an HGF gene and therapeutic agents used
25 therefor. More specifically, the present invention relates to a method of gene therapy for treating myocardiopathy by noninvasive administration of an HGF gene into the cardiac muscle, especially to a method of gene therapy for treating myocardiopathy that more efficiently treat a heart disease, such as cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure, by
30 injecting an HGF gene to the affected part of cardiac muscle under the usage of echo, and to therapeutic agents used therefor. Moreover, the present invention relates to a method of gene therapy which is applicable to genes other than HGF genes and that consists of administering genes

to the part of affected tissue noninvasively under the usage of echo.

Present inventors investigated to find out that effective results are obtained by using an HGF gene as the gene and noninvasively infusing directly to the affected part of cardiac muscle layer. That is, present
5 inventors found out that it is effective to infuse HGF gene to the affected part of cardiac muscle optically using echo without incision of the affected part or thoracotomy. Since this method is a noninvasive treatment, it is possible to administer the present gene repeatedly, according to the condition, and therefore it is possible to treat
10 myocardiopathy efficiently.

Present inventors newly discovered that effective treatments can be done by infusing genes to the affected part optically using echo and showed that the method of the present invention enables genetic treatment of various organ-specific disease.

15 For example, in the case where the HGF gene is used, according to the present invention, it is possible to treat various organ-specific diseases like pulmonary fibrosis, cirrhosis, hepatic fibrosis and so on. Furthermore, genes other than the HGF gene are also effective in the method of the present invention above.

20 Thus, the outline of the present invention is as follows:

- (1) a therapeutic agent for myocardiopathy used for noninvasive administration comprising a hepatocyte growth factor (HGF) gene as the effective ingredient;
- (2) the therapeutic agent of (1), which is used for administration of
25 the HGF gene into the cardiac muscle;
- (3) the therapeutic agent of (1) or (2), wherein the HGF gene is in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome;
- (4) the therapeutic agent of (2) or (3), which is used for noninvasive administration to the affected part of the cardiac muscle under the usage
30 of echo;
- (5) the therapeutic agent of any of (1) to (4), which is to be administered at least 8 times, once a week;
- (6) the therapeutic agent of any of (1) to (5), wherein at least 10 μ g

of the HGF gene is used;

(7) the therapeutic agent of any of (1) to (6), wherein the myocardial pathology is selected from the group consisting of cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure;

5 (8) a gene therapy agent used for noninvasive administration of a gene into an affected part of a tissue under the usage of echo, which comprises genes effective for the treatment of a disorder as the effective ingredient;

(9) the gene therapy agent of (8), wherein the affected part of the tissue
10 is the cardiac muscle;

(10) the gene therapy agent of (8) or (9), wherein the gene is an HGF gene;

(11) a method for gene therapy for myocardial pathology, which comprises the noninvasive administration of an HGF gene into the cardiac muscle of
15 a mammal, including a human;

(12) the method for gene therapy of (11), wherein the HGF gene is in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome;

(13) the method for gene therapy of (11) or (12), wherein the HGF gene is administered noninvasively to a part of an affected cardiac muscle
20 under the usage of echo;

(14) the method for gene therapy of any of (11) to (13), wherein the HGF gene is administered at least 8 times, once per week;

(15) the method for gene therapy of any of (11) to (14), wherein the myocardial pathology is selected from the group consisting of cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure;
25

(16) a method for gene therapy, which comprises the noninvasive administration of genes effective for the treatment of a disorder into an affected part of a tissue under the usage of echo;

(17) the method for gene therapy of (16), wherein the affected tissue
30 is the cardiac muscle;

(18) the method for gene therapy of (16) or (17), wherein the gene is an HGF gene;

(19) use of an HGF gene for the production of a therapeutic agent for

myocardiorathy used for noninvasive administration;

(20) the use of (19), wherein the HGF gene is in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome;

(21) the use of (19) or (20), wherein the therapeutic agent is a therapeutic agent used for the noninvasive administration of the HGF gene to an affected part of the cardiac muscle under the usage of echo;

(22) the use of any of (19) to (21), wherein the myocardiorathy is selected from the group consisting of cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure;

(23) use of a gene for the production of a gene therapy agent used for the noninvasive administration of genes effective for the treatment of a disorder into an affected part of a tissue under the usage of echo;

(24) the use of (23), wherein the affected tissue is cardiac muscle; and

(25) the use of (23) or (24), wherein the gene is an HGF gene.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph showing that gene transfer under usage of echo is possible. It is proven by the high activity rate of luciferase in cardiomyopathy guinea pig, in which luciferase as the reporter gene is introduced to the heart using HVJ.

Figure 2 is a graph showing the result of a comparison between an HGF gene and a control by measuring cardiac capillary vessel density by ALP (alkaline phosphatase) staining.

Figure 3 is a graph showing the result of a comparison of the amount of cardiac bloodstream between an HGF gene group, a control group and a non-treated group by evaluation with a laser Doppler imager (LDI).

Figure 4 is a graph showing the result of a comparison of the distribution density of fibrosis of the heart by measurement using Masson staining.

Best Mode for Carrying out the Invention

As used herein, "HGF gene" means a gene that can express HGF (the

HGF protein). Such genes include genes with deletion of a part of the gene sequence, substitution by another base of the gene sequence, insertion of other base sequence, or binding of bases to the 5' terminus and/or 3' terminus, so long as the expressed polypeptide thereof has substantially the same effect as HGF. For example, HGF genes described in Nature 342:440(1989); Japanese Patent No., 2777678; Biochem.Biophys.Res.Comm. 163:967(1989); and Biochem.Biophys.Res.Comm. 172:321(1990) are included. These genes can be used in the present invention.

The base sequence of the HGF gene (the cDNA encoding HGF) of the present invention has been described in the above literature and is also registered with databases, such as Genbank. Thus, based on such sequence information, a suitable DNA portion is used as a PCR primer; for example, by performing an RT-PCR reaction on mRNA derived from the liver or leukocytes, cDNA of HGF can be cloned. Such cloning can easily be performed by a person skilled in the art according to a basic textbook, such as Molecular Cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Modification and such of the HGF gene can be also readily done by a person skilled in the art according to the above basic textbook.

Subsequently, methods of gene transfer, dosage forms, dose and the like for use in gene therapy of the present invention are explained.

The dosage form of a gene therapy agent comprising the above gene as an effective ingredient to be administered to patients are roughly classified into two groups: one is the case in which a nonviral vector is used, and the other is in which a viral vector is used. Methods for preparation and administration thereof are explained in detail in experimental manuals (Supplement of Experimental Medicine, Basic Technology in gene therapy, Yodosha (1996); Supplement of Experimental Medicine, Experimental Methods in Gene Introduction and Expression Analysis, Yodosha (1997); Handbook for Development and Research of Gene Therapy, Japan Society of Gene Therapy ed., NTS (1999)). Specifics are explained below.

A. Usage of a nonviral vector

A recombinant expression vector, in which a gene of interest has been integrated into a commonly used gene expression vector, may be used to introduce the gene of interest into cells or tissue by the following method etc.

5 Illustrative methods of gene transfer into cells include the lipofection method, calcium phosphate co-precipitation method, DEAE-dextran method, direct DNA introduction methods using micro glass tubes, and the like.

Regarding methods of gene transfer into the tissue, the recombinant
10 expression vector may be incorporated into the cell by subjecting it to any method, such as the gene transfer method with internal type liposome, method of gene introduction with electrostatic type liposome, HVJ-liposome method, improved HVJ-liposome method (HVJ-AVE liposome method), receptor-mediated gene introduction method, method of
15 introducing DNA molecules together with carriers (metal particles) by a particle gun, method of directly introducing naked-DNA, method of introduction with positively-charged polymers and the like.

Among them, the HVJ-liposome is a fusion product prepared by enclosing a DNA into a liposome made of lipid bilayer, which is fused
20 to inactivated Sendai virus (Hemagglutinating virus of Japan: HVJ). The HVJ-liposome method is characterized by very high fusing activity with the cell membrane as compared to the conventional liposome method, and is a preferred mode of introduction. For the method of preparing HVJ-liposome, see, the literature for details (Separate volume of
25 Experimental Medicine, Basic Technology in gene therapy, Yodosha (1996); experimental Methods in Gene Introduction and Expression Analysis, Yodosha (1997); J.Clin.Invest. 93:1458-1464(1994); Am.J.Physiol. 271:R1212-1220 (1996)) and the like, and experimental examples described below for details.

30 In particular, the Z strain (available from ATCC) is preferred as the HVJ strain, but other HVJ strains (for example, ATCC VR-907 and ATCC VR-105) may also be used.

Furthermore, the method of directly introducing naked-DNA is the

most simple method among the methods described above, and in this regard a preferred method of introduction.

Expression vectors as used herein may be any expression vectors so long as they permit the *in vivo* expression of the gene of interest. Examples include expression vectors such as pCAGGS (Gene 108:193-200(1991)), pBK-CMV, pcDNA3.1, pZeoSV (Invitrogen, Stratagene) and the like.

B. Usage of a viral vector

Representative methods that use viral vectors include those using viral vectors such as recombinant adenovirus, retrovirus and the like. More specifically, the gene of interest can be introduced into a DNA virus such as detoxified retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus, herpesvirus, vaccinia virus, poxvirus, poliovirus, Sindbis virus, Sendai virus, SV40, human immunodeficiency virus (HIV) and the like, which is then infected to the cell to introduce the gene into the cell.

Among the above viral vectors, the efficiency of infection of adenovirus is known to be much higher than that of other viral vectors. In this regard, it is preferred to use an adenovirus vector system.

As methods of introducing a gene therapy agent into a patient, there are *in vivo* methods, which permit direct introduction of the gene therapy agent into the body, and *ex vivo* methods, in which certain cells are removed from human, to which the gene therapy agent is introduced and which are returned into the body thereafter (Nikkei Science, April 1994 issue pp.20-24; Monthly Yakuji, 36(1): 23-48 (1994); Supplement To Experimental Medicine 12(15) (1994); Handbook for Development and Research of Gene Therapy, NTS (1999)). According to the present invention, the *in vivo* method is preferred.

Dosage forms may take various forms according to various administration regimens described above (for example, liquids). When, for example, an injection containing the gene as an effective ingredient is to be used, said injection may be prepared by dissolving the effective ingredient(s) into a standard solvent (a buffer such as PBS, physiological saline, sterile water, etc.). The injection liquid may then be

filter-sterilized with filter as needed and then filled into sterilized containers. Conventional carriers and soon may be added to the injection. Liposomes, such as HVJ-liposome, may take the form of suspensions, frozen formulations, centrifugation-concentrated frozen formulations, and the like.

In addition to the HGF gene introduced in this invention, it is possible to use endogenous cardiac muscle protective factors or regeneration factors against cardiac muscle. For example, it is reported that factors, such as TGF- β and heat shock protein (HSP) expressed highly during damage of the cardiac muscle, reduce myocardial pathology and are engaged in the repair of cardiac muscle. Therefore, it is possible to use the genes encoding them. Moreover, growth factors, such as EGF, are reported to repair cell damage in various tissues and genes encoding them can be also used. In addition to these cardiac muscle protective factors and regeneration factors, factors related to protection and regeneration of the cardiac muscles can be utilized.

According to the invention, it is possible to deliver the protein of interest to damaged cells, such as cardiac muscle cells, by introducing an HGF gene, alone or together with other genes, to the cardiac muscle cell of the heart and highly expressing them. This enables activation of repair and regeneration of the damaged cardiac muscle and such, and recuperation of the cardiac function involved in myocardial pathology. Hence, the gene therapy agent of this invention can be applied to patients with critical cardiomyopathy, and offers remedy for patients for whom no options, other than heart transplantation, are left.

Moreover, the therapeutic agent of this invention can be applied not only to patients with severe cardiomyopathy but also to patients with progressive mild cardiomyopathy. It is applicable to patients of myocardial pathology-like angina pectoris and heart failure as well.

Proper methods and sites for administration adequate for the disease or symptom to be treated are selected for the gene therapy agent of this invention. Cardiac muscle (affected part of the cardiac muscle) is a preferable administration site. As to the administration methods,

parenteral administration methods are preferred.

Examples of parenteral administration methods include administration by noninvasive catheter, noninvasive injector and so on. More preferred are administration methods which utilize noninvasive catheter, noninvasive injector and such under the usage of echo. As a method using noninvasive catheter, for example, methods like injecting HGF genes directly can be indicated.

Dosage of the therapeutic agent of this invention varies depending on the symptoms of the patient but HGF genes 0.0001 mg to 100mg, preferably about 0.001 to 10 mg per adult patients can be defined.

When the HVJ-liposome form is chosen, HGF genes of a range of about 1 to about 4000 μ g, preferably about 10 to about 400 μ g per adult patient is selected.

The therapeutic agent of this invention is suited for administration once every few days or every few weeks, and administration once per week is preferred.

Frequency of administration is to be selected depending on the symptoms of the patients. In compliance with the object of the treatment, plural administration is suitable, and preferably administration of 8 times can be indicated.

Further to the present invention, a new gene therapy method and therapeutic agent used therefor, including noninvasive administration of therapeutically effective gene for the treatment of the disorder to the affected tissue site under the usage of echo, is presented. That is, it was revealed for the first time that effective treatments can be achieved visually by administering directly the gene to the affected tissue under the usage of echo. According to the therapeutic treatment of the invention, genes are administered noninvasively and therefore desired genes can be administered as much as the condition demands, which is advantageous as compared to former methods. Gene therapy methods of this invention can be applied to any genes, in addition to HGF gene. This gene therapy method of the invention is particularly effective when applied to the affected site of cardiac muscle. Genes administered in

such situations include the HGF gene, TGF- β gene, HSP gene, VEGF gene, FGF gene, EGF gene and so on.

The present invention will now be specifically explained with reference to the following examples. It should be noted, however, that the present invention is not limited by these examples in any way.

Materials and Methods

Experimental Animals

Hamster model for cardiomyopathy (cardiomyopathy hamster; Bio14.6) was purchased from Oriental Yeast.

HGF gene

Human HGF gene was cloned from human HGF cDNA (Japanese Patent No.2777678) according to a conventional method and was inserted into the expression vector pcDNA (Invitrogen).

Experimental Procedure

1. Reporter gene luciferase was introduced into the cardiomyopathy hamster by HVJ liposome under the usage of echo. A week later, the activity of the luciferase was measured. Animals into which PBS was introduced alone under the usage of echo were used as the control. Luciferase activity was measured by a luminometer (LamatLB9507 (BERTHOLO)).
2. Under the usage of echocardiogram (MD500, YOKOKAWA-GE), HVJ-liposome agent was injected into the abdominal lateral cardiac muscle of the heart of myocardiopathy hamster (12 weeks old) and was subjected to following investigations:
 - 1) Density of blood capillary in the cardiac muscle was measured by ALP (alkaline phosphatase) staining and the result of the HGF gene was compared to that of the control.
 - 2) Bloodstream of the heart to which HVJ-liposome was administered was evaluated by laser Doppler imager (LDI) score and the result of the HGF gene was compared to that of the control.
 - 3) After Masson staining of the cardiac muscle, distribution density of fibrosis was measured by computer analysis. Result of the HGF gene

was compared to that of the control.

Reference 1

Preparation of HVJ-liposome agent

5 10 mg Dried lipid (a 1:4.8:2 mixture of phosphatidyl serine, phosphatidyl choline and cholesterol) and 200 μ l balanced salt solution (137 μ M NaCl, 5.4 μ M KCl, 10 μ M Tris-HCl; pH7.6) containing HGF gene (100 μ g)-HMG1 (high mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g) was mixed and, by stirring vigorously with ultrasonication, liposomes were formed.
10 Purified Sendai virus (Z strain) was irradiated with UV (110erg/mm²/sec) for 3 minutes. Liposome suspension was mixed with Sendai virus (HVJ), heated at 4°C for 10 minutes, and then heated at 37°C for 30 minutes. Free HVJ was discarded and thus obtained HVJ liposome agent.

15 Reference 2

Measurement on luciferase activity

Liposome agent with 10 μ g of luciferase gene was administered to hamsters (6 animals per group). A week later, luciferase activity was measured. Results are shown in Figure 1.

20 As shown in Figure 1, high levels of luciferase activity were exhibited in the heart. Thus, it was revealed that gene transfer under the usage of echo is possible.

Experiment 1

25 Treatment of myocardiopathy hamster with HGF gene

Luciferase agent was injected into the abdominal lateral cardiac muscle of the heart of myocardiopathy hamsters (12 weeks old, 6 animals per group). A group of myocardiopathy hamsters (12 weeks old, 6 animals per group) to which liposome agent containing control vectors was injected
30 in the same manner was used as the control and untreated myocardiopathy hamsters (6 animals per group) were used as the untreated group. Then liposome agents were injected once each week for 8 times. 8 weeks later, density of blood capillary in the cardiac muscle of the heart of the

20 week old myocardial hamsters was measured by ALP staining, and bloodflow was evaluated by the LDI score. After euthanization of the hamsters, the heart was extirpated and after Masson staining, distribution density of fibrosis was measured by computer analysis.

5 ALP staining revealed significant rise in blood capillary by angiogenesis in HGF gene treatment group. The results are shown in Figure 2.

Concerning LDI score, taking the control group as 100%, the HGF gene treatment group was $163 \pm 7\%$, which indicates significant increase
10 in bloodflow. The results are shown in Figure 3.

According to the analysis of Masson staining, significant decrease in distribution density of fibrosis was observed in HGF gene treatment group. The results are shown in Figure 4.

15 Industrial Applicability

Therapeutic agents for myocardial hamsters comprising an HGF gene of this invention induce angiogenesis of the affected part of cardiac muscle, increase bloodflow of the affected part while repressing and reducing fibrosis of the cardiac muscle it can repair the cardiac function.
20 Moreover, therapeutic agents of this invention can be injected noninvasively and accurately to the affected cardiac muscle layer visually under the usage of echo. Therefore, therapeutic agents of the invention enable more effective treatment of myocardial hamsters.

CLAIMS

1. A therapeutic agent for myocardial pathology used for noninvasive administration comprising a hepatocyte growth factor (HGF) gene as the effective ingredient.
2. The therapeutic agent of claim 1, which is used for administration of the HGF gene into the cardiac muscle.
3. The therapeutic agent of claim 1 or 2, wherein the HGF gene is in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome.
4. The therapeutic agent of claim 2 or 3, which is used for noninvasive administration to the affected part of the cardiac muscle under the usage of echo.
5. The therapeutic agent of any of claims 1 to 4, which is to be administered at least 8 times, once a week.
6. The therapeutic agent of any of claims 1 to 5, wherein at least 10 μ g of the HGF gene is used.
7. The therapeutic agent of any of claims 1 to 6, wherein the myocardial pathology is selected from the group consisting of cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure.
8. A gene therapy agent used for noninvasive administration of a gene into an affected part of a tissue under the usage of echo, which comprises genes effective for the treatment of a disorder as the effective ingredient.
9. The gene therapy agent of claim 8, wherein the affected part of the tissue is the cardiac muscle.
10. The gene therapy agent of claim 8 or 9, wherein the gene is an HGF gene.
11. A method for gene therapy for myocardial pathology, which comprises the noninvasive administration of an HGF gene into the cardiac muscle of a mammal, including a human.
12. The method for gene therapy of claim 11, wherein the HGF gene is in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome.
13. The method for gene therapy of claim 11 or 12, wherein the HGF gene

is administered noninvasively to a part of an affected cardiac muscle under the usage of echo.

14. The method for gene therapy of any of claims 11 to 13, wherein the HGF gene is administered at least 8 times, once per week.

5 15. The method for gene therapy of any of claims 11 to 14, wherein the myocardiopathy is selected from the group consisting of cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure.

16. A method for gene therapy, which comprises the noninvasive administration of genes effective for the treatment of a disorder into
10 an affected part of a tissue under the usage of echo.

17. The method for gene therapy of claim 16, wherein the affected tissue is the cardiac muscle.

18. The method for gene therapy of claim 16 or 17, wherein the gene is an HGF gene.

15 19. Use of an HGF gene for the production of a therapeutic agent for myocardiopathy used for noninvasive administration.

20. The use of claim 19, wherein the HGF gene is in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome.

21. The use of claim 19 or 20, wherein the therapeutic agent is a therapeutic
20 agent used for the noninvasive administration of the HGF gene to an affected part of the cardiac muscle under the usage of echo.

22. The use of any of claims 19 to 21, wherein the myocardiopathy is selected from the group consisting of cardiomyopathy, angina pectoris and heart failure.

25 23. Use of a gene for the production of a gene therapy agent used for the noninvasive administration of genes effective for the treatment of a disorder into an affected part of a tissue under the usage of echo.

24. The use of claim 23, wherein the affected tissue is cardiac muscle.

25. The use of claim 23 or 24, wherein the gene is an HGF gene.

ABSTRACT

This invention enables the repair of cardiac function by noninvasive administration of an HGF gene in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome
5 into the affected cardiac muscle, thereby inducing angiogenesis of the cardiac muscle layer and repressing fibrosis.

This Page Blank (uspto)